
MICROBOUTURAGE DU SEQUOIA GÉANT

O. MONTEUUIS - M.C. BON

Étude réalisée au Laboratoire de Phytomorphogenèse,
U.A. 45 - C.N.R.S. 4 rue Ledru, 64038 Clermont-Ferrand Cedex
avec la participation technique de S. Genestier

Class. Oxford 174.7 : 165.4

SOMMAIRE

1. introduction	50
2. matériel et techniques expérimentales	50
21 - matériel végétal.	50
22 - modalités de culture.	51
221 - salle climatique	51
222 - culture in vitro	51
23 - mesures et observations	51
231 - échantillonnage	51
232 - dosages biochimiques et mesures physico-chimiques	51
233 - analyses morphogénétiques	52
3. effets du milieu de culture	53
31 - milieu de multiplication	54
311 - composition minérale	54
312 - substances de croissance	56
313 - position de l'explant.	59
32 - milieu d'allongement	60
33 - milieu de rhizogenèse	62
331 - substances de croissance et dérivés	63
332 - concentration de la solution minérale	66
333 - saccharose	67
334 - charbon actif	67
335 - consistance du milieu	68
4. aspects physiologiques	72
5. hyperhydrie	76
51 - données relatives au milieu de culture	76
52 - données relatives aux explants	78
6. sortie de tube, acclimatation	79
7. discussion générale	80
8. conclusion	83
Bibliographie	84
Résumé	86
Summary	86
Zusammenfassung	87

1. introduction

L'intérêt potentiel du séquoia géant (*Sequoiadendron giganteum* (Lindl.) Buchholz) pour la foresterie française, déjà évoqué dans de précédentes publications (Destremau et Guinaudeau, 1980), se concrétise à travers la dynamique de plantations entreprises depuis 1982 par l'AFOCEL. La politique de sylviculture clonale appliquée à cette essence reste conditionnée par la multiplication végétative, essentiellement par bouturage, des sujets sélectionnés. A cet effet, les possibilités offertes par des conditions horticoles traditionnelles ont été récemment analysées (Monteuuis, 1984). Parallèlement, le recours aux techniques de propagation *in vitro*, microbouturage notamment, peut se justifier pour faciliter le clonage de certains génotypes intéressants. Cette dernière solution nécessite une étude préalable du comportement de l'espèce *in vitro* dans différentes conditions imposées. Ce peut être également l'occasion de s'intéresser, d'un point de vue physiologique, à l'influence de certains facteurs, tant exogènes qu'endogènes, sur le devenir morphogénétique de segments végétatifs d'une espèce peu étudiée jusqu'alors. La synthèse des résultats obtenus à ce jour fait l'objet de cet article.

●

2. matériel et techniques expérimentales

21 - MATÉRIEL VÉGÉTAL

Les observations sont réalisées sur le clone «juvénile» 45.115, issu du bouturage en cascade d'un jeune semis, que nous avons comparé dans certaines conditions précisées aux clones 03, 04 et 15, prélevés sur des sujets centenaires. Dans ce dernier cas, il s'agit de greffes. Ce matériel, multiplié durant les années 1983 et 1984, ne dépasse pas 30 cm de hauteur. Les caractéristiques respectives de ces quatre clones, et notamment leur aptitude à la régénération végétative *in vivo*, ont été décrites dans une précédente étude (Monteuuis, 1984).

22 - MODALITÉS DE CULTURE

221 - SALLE CLIMATIQUE

Les pieds-mères sont cultivés en mottes Melfert (modèle 102), repiqués dans des conteneurs de 30 l, garnis de substrat horticole et modérément fertilisés par une solution d'engrais complet 10.8.6 une fois par trimestre. L'ensemble est entreposé dans une salle climatique destinée à stabiliser l'environnement. L'éclairage, programmé de 6 h à 22 h, est assuré par des tubes fluorescents «Mazda fluor, Lumière du jour de luxe», totalisant une énergie de 17 W/m². La température est fixée à 21 ± 1°C pour une hygrométrie de 75 %.

222 - CULTURE IN VITRO

Le pH des différents milieux de culture est ajusté à 5,5 par une solution de KOH (0,1 M). Répartis à raison de 20 ml/tube de culture, ces milieux sont ensuite stérilisés par un autoclavage de 20 mn à 120°C. Le charbon actif (C.A.) du milieu M20 est ajouté stérilement après autoclavage (voir § 5). Les manipulations en conditions d'aseptie sont effectuées sous hotte à flux laminaire. A l'origine, les microboutures sont des portions terminales, de 1 cm de long, d'axes végétatifs prélevés sur les pieds-mères en salle climatique. La désinfection consiste en un trempage de 5 mn dans de l'éthanol à 50 %, suivi de 5 mn dans une solution de HgCl₂ à 1 ‰, puis de trois rinçages dans de l'eau distillée stérilisée. Sauf indication contraire, les explants sont repiqués en position verticale. Les conditions ambiantes hors tube sont identiques à celles de la salle climatique, excepté l'énergie lumineuse qui est de 14 W/m².

23 - MESURES ET OBSERVATIONS

231 - ÉCHANTILLONNAGE

L'effectif total de l'échantillon analysé par variante de traitement est noté N et correspond à une ou plusieurs répétitions r, précisé dans ce dernier cas. Les divers tests statistiques utilisés sont appliqués avec un seuil de signification Po égal à 5 %.

232 - DOSAGES BIOCHIMIQUES ET MESURES PHYSICO-CHIMIQUES

- *dosage des composés phénoliques*

Le matériel frais, broyé dans une solution d'éthanol à 80° à 0°C, est extrait à deux reprises pendant 10 mn. Après filtration sur verre fritté n° 4 et évaporation à sec, le résidu est lavé trois fois par l'éther de pétrole (35-50°). La fraction étherée est additionnée de 10 ml d'eau. La phase aqueuse constitue l'extrait phénolique total. Selon le protocole établi par Marigo (1973), la quantité de composés phénoliques, mesurée au spectrophotomètre à 760 nm, est exprimée en utilisant comme référence l'acide gallique.

- *dosages de K et Na*

K et Na sont dosés au spectrophotomètre de flamme Beckman (K, Li, Na) après déshydratation à 80°C, puis incinération à 550°C des échantillons de microboutures.

- *mesures de pH*

Le pH des milieux gélosés est mesuré au pH-mètre Tacussel Minisis 5000 par l'intermédiaire d'une électrode combinée Tacussel TC BC 11/250/HS.

233 - ANALYSES MORPHOGÉNÉTIQUES

L'appréciation de l'aptitude morphogène est indiquée par des observations qualitatives ou quantifiées sous forme de moyennes rapportées à l'effectif total observé N, explants non réactifs compris. Les principaux indices retenus sont :

Na : nombre moyen d'axes végétatifs de longueur supérieure à 5 mm par explant,

Ac : allongement moyen de l'axe principal, exprimé en mm, au terme de la culture en tenant compte de la baisse de niveau du milieu gélosé,

Ra : pourcentage de boutures enracinées (racines allongées bien visibles).

Sauf précision contraire, les relevés sont effectués après un temps de culture fixé à trois semaines sur milieu de multiplication, 8 semaines sur milieu d'allongement et six semaines sur milieu d'expression rhizogène.

•

Principales abréviations :

Ac : Accroissement en longueur (mm)
AIB : Acide 4 indole-3-butyrique
ANA : Acide α -naphtalène acétique
BAP : 6 Benzyl-amino-purine
IPA : Isopentényladénine
MA : Milieu d'allongement
MM : Milieu de multiplication
MRE : Milieu de rhizogenèse : expression
MRI : Milieu de rhizogenèse : induction

N : Effectif total de l'échantillon par variante de traitement
Na : Nombre moyen de pousses supérieures à 5 mm
r : Nombre de répétitions pour une variante de traitement donnée
Ra : Pourcentage de boutures enracinées
Po : Seuil de signification fixé à 0,05
P : Degré de signification.

3. effets du milieu de culture

Des essais préliminaires nous ont incités à utiliser les équilibres minéraux Murashige et Skoog (M) ou Knop (K) en faisant varier leur concentration globale. Ces différentes compositions, détaillées tableau n° 1, sont associées à d'autres composants pour constituer les milieux de culture exposés tableau n° 2.

TABLEAU N° 1
Composition des solutions de macroéléments utilisées
(a) en mg/l

Milieux	K/2	K	2K	M
Macroéléments				
NH ₄ NO ₃				825
KNO ₃	125	250	500	950
CaCl ₂ , 2H ₂ O				220
MgSO ₄ , 7H ₂ O	125	250	500	185
KH ₂ PO ₄	125	250	500	85
Ca(NO ₃) ₂ , 4H ₂ O	500	1000	2000	

(b) en meq/l

Milieux	K/2	K	2K	M
Ions				
K ⁺	2,14	4,29	8,58	10,05
NH ₄ ⁺				10,3
Na ⁺				
Ca ⁺⁺	4,24	8,48	16,96	3
Mg ⁺⁺	1,02	2,04	4,08	1,5
Total cations (meq/l)	7,4	14,81	29,62	24,85
NO ₃ ⁻	5,46	10,93	21,86	19,7
H ₂ PO ₄ ⁻	0,92	1,84	3,68	0,65
SO ₄ ⁻	1,02	2,04	4,08	1,5
Cl ⁻				3
Total anions (en meq/l)	7,4	14,81	29,62	24,85
Total (meq/l)	14,8	29,62	59,24	49,70
Total (en mM/l)	11,67	23,34	46,68	46,65

TABLEAU N° 2
Composition des différents milieux de culture testés

Milieux	K/2	K	2K	M
Composants				
Macroéléments	K/2	K	2K	M
FeSO ₄ 7H ₂ O	13,9	13,9	27,8	13,9
Na ₂ EDTA	18,6	18,6	37,3	18,6
MnSO ₄ 4H ₂ O	11,2	11,2	11,2	11,2
ZnSO ₄ 7H ₂ O	4,3	4,3	4,3	4,3
H ₃ BO ₃	3,1	3,1	3,1	3,1
KI	0,41	0,41	0,41	0,41
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,012	0,012	0,012	0,012
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,012	0,012	0,012	0,012
AlCl ₃ 6H ₂ O	0,025	0,025	0,025	0,025
Myo inositol	50	50	50	50
Glycocolle	2	2	2	2
Pyridoxine	1	1	1	1
Acide nicotinique	1	1	1	1
Thiamine	1	1	1	1
Saccharose	5000	30000	30000	30000
Gélose (Bacto - Agar - DIFCO)	7000	7000	7000	7000

- toute modification de constituant considéré comme facteur d'analyse est indiquée dans le texte ou sur les figures;
- la composition des différentes solutions de macroéléments est détaillée dans le tableau n° 1;
- les quantités sont exprimées en mg/l.

31 - MILIEU DE MULTIPLICATION

L'effet recherché est l'augmentation du nombre d'axes végétatifs Na par rapport à l'effectif total initialement introduit N. A cette fin, nous avons analysé l'influence de plusieurs paramètres sur ce milieu dit de «multiplication», dont les effets ont été suivis après passage sur milieu d'allongement. Les observations sont effectuées sur des cultures primaires.

311 - COMPOSITION MINÉRALE

Le milieu minéral peut favoriser la multiplication du matériel végétal introduit en réduisant sur l'ensemble de la culture les cas de mortalité, d'inertie, d'hypolignification et autres formes de dégénérescence et en stimulant l'organogenèse des explants réactifs. Nous avons testé l'influence de la solution minérale sur le devenir de microboutures cultivées avec ou sans régulateurs de croissance exogènes. L'analyse porte sur les milieux K, 2K et M.

La figure 1a indique un effet positif de la solution Knop concentrée (2K) par rapport à la concentration habituelle (K) sur l'accroissement Ac dès l'introduction primaire sur milieu de multiplication MM, puis sur l'accroissement et le nombre moyen d'axes par explant après repiquage sur milieu d'allongement. Ces observations ont été confirmées lors d'un deuxième essai dont les résultats figurent dans le tableau n° 5a. La différence entre les milieux minéraux 2K et M est, par contre, moins nette (figures 1b et

FIGURE 1
*Milieu de multiplication : influence de la solution minérale
et des phytorégulateurs (en mg/l)*

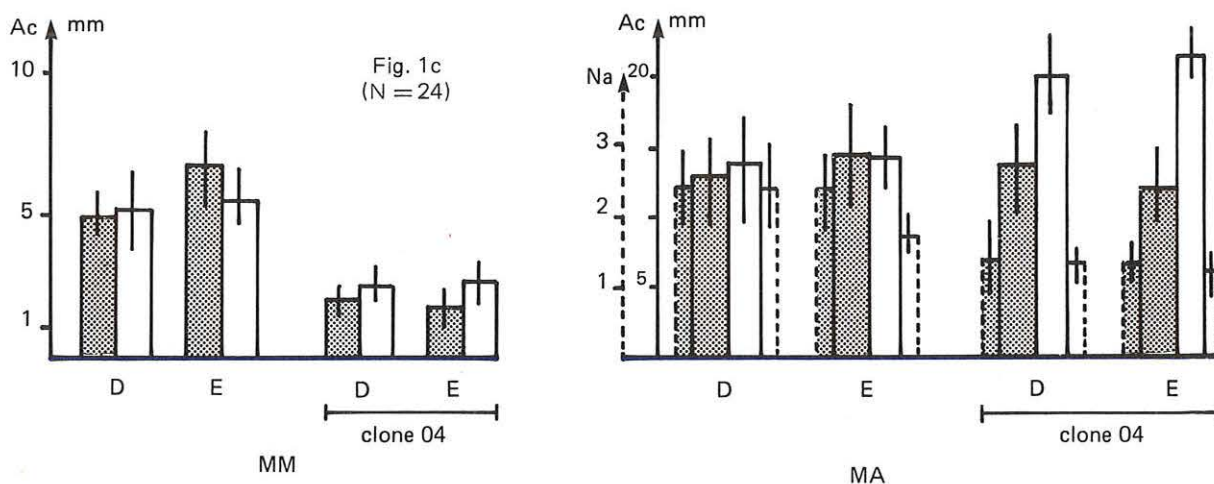
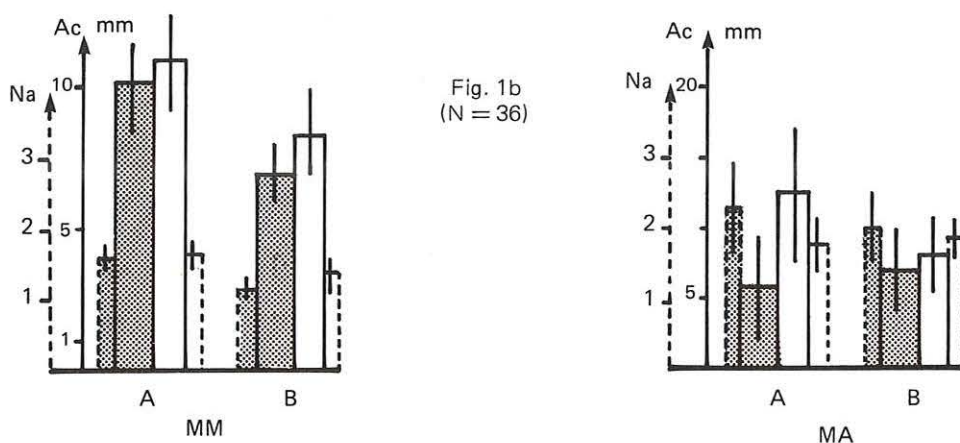
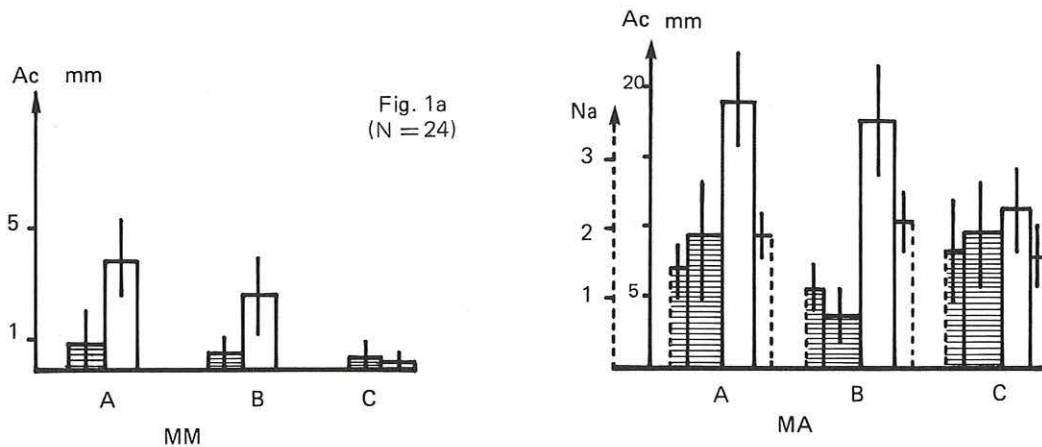
les observations sont effectuées pour chaque variante après trois semaines de culture sur MM, puis
au bout de huit semaines sur MA (M20), avec :



A : BAP = 0; ANA = 0
B : BAP = 0,1; ANA = 0,01
C : BAP = 0,5; ANA = 0,01
D : BAP = 0,225; ANA = 0,05
E : BAP = 0,225; ANA = 0,1

Ac = allongement moyen de l'axe principal, en mm, au terme de la culture

Na = nombre moyen d'axes végétatifs de longueur supérieure à 5 mm par explant



1c). Il semble donc que ce soit essentiellement la salinité du milieu qui ait une incidence sur Ac et Na. Néanmoins, les différences qualitatives de composition de ces deux solutions se font sentir au niveau morphologique : les nouvelles feuilles formées sont sensiblement plus petites sur les milieux K et 2K que sur milieu M.

312 - SUBSTANCES DE CROISSANCE

Les milieux dits de « multiplication » contiennent généralement des cytokinines. Ces phytorégulateurs sont censés stimuler le bourgeonnement et auraient d'autre part un effet antisénescent mis à profit pour favoriser la réapparition de caractéristiques des formes juvéniles (Fouret et al., 1984).

• nature

Dans le cas des Gymnospermes, la BAP est traditionnellement préférée aux autres cytokinines (David, 1982). Nous avons tenu néanmoins à comparer cette substance synthétique à l'IPA, cytokinine naturelle, donc théoriquement plus souple d'emploi (tableau n° 3). La supériorité de la BAP par rapport à l'IPA, déjà discernable par la taille des bourgeons sur milieu de multiplication, se révèle encore après passage sur milieu d'allongement. Le nombre moyen d'axes végétatifs Na est significativement plus élevé lorsque les explants ont été préalablement cultivés en présence de BAP. Cette différence résulte à la fois d'une inertie ou mortalité plus forte (« explants non réactifs ») et d'un nombre moyen de ramifications N'a plus faible dans le cas d'apport d'IPA dans le milieu de multiplication.

TABLEAU N° 3
Effets comparatifs de BAP et IPA
associées à 0,01 mg/l d'ANA dans le milieu minéral K
(les observations sont effectuées après repiquage sur milieu d'allongement M20)

Traitements préalables	N	Explants non réactifs	Na	N'a*
BAP : 0,1 mg/l.	40	4	2,6	2,9
IPA : 3 mg/l	40	10	1,6	2,1
p (test F).			≈ 0,001	< 0,01

* N'a : nombre moyen de ramifications établi à partir des seuls explants réactifs.

Par ailleurs (tableau n° 4) nous avons pu constater que l'addition à la BAP de faibles quantités d'ANA (0,01 mg/l) améliore le coefficient de multiplication de la culture, Na, ainsi que la qualité des boutures obtenues.

• concentration et durée d'application

L'influence de différentes concentrations de BAP, avec ou sans ANA, a été analysée successivement sur milieu de multiplication, puis sur milieu d'allongement M20 (figure n° 1, tableaux n° 4 et 5). Les mesures réalisées

montrent que des teneurs de 0,1 à 0,5 mg/l de BAP associées à 0,01 mg/l d'ANA paraissent les plus indiquées et peuvent occasionnellement faciliter l'enracinement (tableau n° 4). La croissance des explants est inversement proportionnelle à la quantité de BAP dans le milieu de culture (tableaux n° 4 et 5c) et des concentrations de 1 mg/l ou plus provoquent une hypertrophie du bourgeon terminal (aspect en « chou-fleur ») bloquant toute elongation ultérieure. L'examen après dissection sous loupe binoculaire révèle alors un développement démesuré de l'épaisseur des feuilles et des bourgeons, quel que soit leur stade de développement.

L'effet des cytokinines augmente avec le temps de traitement (Arnold et Eriksson, 1981). Des séjours trop longs sur milieux M ou 2K additionnés de 0,1 à 0,5 mg/l de BAP (interaction avec milieu minéral (tableau n° 5d) inhibent la croissance et, de ce fait, réduisent le coefficient de multiplication. Il convient donc de déterminer le temps de culture adapté à une concentration donnée de cytokinine. Cette durée a été fixée à trois semaines pour des doses de BAP comprises entre 0,1 et 0,5 mg/l.

TABLEAU N° 4
*Effets de différentes concentrations (en mg/l) de BAP et d'ANA
dans le milieu K sur l'organogenèse des microboutures*

Traitements (mg/l)	Résultats après 5 semaines de culture sur milieu K,			puis 8 semaines après repiquage sur milieu d'allongement M20		
	Ba	Bb	Ac	Na	Ac	Ra
BAP : 1 ANA : 0,1	+++	+	O _a	1,2	0,5 _d	0
BAP : 0,5 ANA : 0,01	++ (+)	+	0,3 _{a,b}	2	2,2 _{d,e}	12,5
BAP : 0,5 ANA : 0	++	+	0,7 _{a,b}	1,3	1,4 _d	13,6
BAP : 0,1 ANA : 0	+	+	1,6 _b	1,8	6 _e	5
BAP : 0 ANA : 0	(+)	(+)	3,5 _c	1,5	6,5 _e	0

Conventions :
Ba : bourgeonnement apparent apical
Bb : bourgeonnement apparent basal
Ac : allongement moyen en mm, de l'axe principal au terme de la culture
Na : nombre moyen d'axes végétatifs de longueur supérieure à 5 mm par explant
Ra : pourcentage d'enracinement
Le nombre de « + » indique l'intensité du phénomène
Les indices alphabétiques (a, b, c,...) distinguent les résultats significativement différents (test de DUNCAN, Po = 0,05, N = 24, r = 1)

TABLEAU N° 5
Analyses, 8 semaines après repiquage sur milieu d'allongement M20,
de différentes composantes du milieu de multiplication
appliquées durant 3 semaines

Milieu minéral :		K					2K				
		N	v	n.r	Ac	Na	N	v	n.r	Ac	Na
A*	BAP = 0	V	10	0	0	8,7	11	0	0	22,2	2,2
	ANA = 0	H	10	0	1	11,2	11	3	0	21,3	2,8
B	BAP = 0,1	V	6	0	0	2,7	12	0	1	18,8	2,5
	ANA = 0,01	H	6	0	1	4,8	12	0	1	14,5	2,7
C	BAP = 0,5	V	8	0	0	5,7	10	0	1	7,7	1,7
	ANA = 0,01	H	9	0	1	13,5	12	2	1	12,8	1,7

* Les quantités sont exprimées en mg/l

Facteurs ou combinaisons ayant un effet significatif sur Na ou Ac ($p \leq 0,05$)

TABLEAU N° 5a
Effet milieu minéral

	K	2K
Na ($p < 0,01$)	1,6 _a	2,3 _b
Ac ($p < 0,001$)	7,8 _a	16,2 _b

TABLEAU N° 5d
Effet milieu x substances de croissance

	K.B	K.A	2K.C	K.C	2K.A	2K.B
Na ($p < 0,05$)	1,3 _a	1,6 _a	1,7 _a	2,0 _{a,b}	2,5 _b	2,6 _b
Ac ($p < 0,001$)	3,7 _a	9,9 _b	10,2 _b	9,6 _b	21,8 _d	16,7 _c

TABLEAU N° 5b
Effet position de l'explant

	V	H
Na ($p < 0,025$)	1,6 _a	2,3 _b
Ac ($p < 0,05$)	10,9 _a	13 _b

TABLEAU N° 5e
Effet position x substances de croissance

	V.C	H.B	V.B	H.C	V.A	H.A
Ac ($p < 0,01$)	6,7 _a	9,7 _{a,b}	10,7 _b	13,2 _b	15,4 _c	16,3 _c

TABLEAU N° 5c
Effet substances de croissance

	C	B	A
Ac ($p < 0,001$)	9,9 _a	10,2 _a	15,8 _b

TABLEAU N° 5f
Effet position x milieu minéral

	V.K	H.K	V.2K	H.2K
Ac ($p < 0,05$)	5,7 _a	9,8 _b	16,2 _c	16,2 _c

Conventions :

Ac : allongement moyen en mm, de l'axe principal au terme de la culture
Na : nombre moyen d'axes végétatifs de longueur supérieure à 5 mm par explant
v : nombre d'explants vitreux
n.r : nombre d'explants non réactifs
V : explant en position verticale
H : explant en position horizontale
Les indices alphabétiques (a, b, c,...) distinguent les variantes de traitement significativement différentes (test de DUNCAN).



Photo 1. — Explant sur milieu d'allongement après culture sur milieu de multiplication

313 - POSITION DE L'EXPLANT

Lorsque les explants sont introduits verticalement, les cytokinines provoquent un accroissement préférentiel des bourgeons de la zone apicale et de la base, en contact avec le milieu de culture. Sur le pommier « Everest », Danjou (communication personnelle) remarque que le fait de placer horizontalement l'explant sur le milieu favorise la prolifération de jeunes pousses. D'autres auteurs : Bornman et Vogelmann (1984), David (1982), signalent également l'influence de la position de l'explant sur son devenir, du fait entre autres, de la surface de contact accrue avec le milieu. Ces références nous ont incités à comparer des microboutures en position verticale à leurs homologues posées horizontalement sur différents milieux.

Les résultats obtenus sont très variables en fonction des lots d'explants introduits, comme l'illustre la comparaison entre les tableaux n° 5b et n° 6. Dans ce dernier cas, les explants en position horizontale sont beaucoup plus affligés par des phénomènes d'inertie ou de dégénérescence tels que la vitrification. Ces différences de comportement des échantillons ne permettent pas de conclure quant à l'intérêt d'introduire l'explant en position verticale ou horizontale sur le milieu de culture.

TABLEAU N° 6

*Influence de la position de l'explant sur le milieu de multiplication X2K;
les observations sont effectuées après repiquage sur M20.*

	N	n.r	Na	N'a
Position verticale (V)	80	14	2,1	2,5
Position horizontale (H)	80	39	1,1	2,2
P		< 0,001 (test χ^2)	< 0,001 (test F)	> 0,05 (test F)

n.r : nombre d'explants non réactifs

Na : nombre moyen d'axes végétatifs de longueur supérieure à 5 mm

N'a : Na rapporté à l'effectif N-n.r

32 - MILIEU D'ALLONGEMENT

La fonction première du milieu d'allongement est de favoriser la croissance des explants et, si possible, de garantir leur pérennité au fil des sub-cultures. L'utilisation d'un tel milieu se fait sentir dans diverses situations : introduction primaire et acclimatation *in vitro* en vue d'une rhizogenèse ultérieure ou d'une série de sub-cultures, développement de pousses induites sur milieu de multiplication, conservation de matériel végétal sélectionné...

Dans le cadre de notre travail, l'étude de l'influence de la solution minérale et du charbon actif, grandement bénéfique pour certains conifères (Boulay, 1984; David, 1982), a été privilégiée au détriment des phyto-régulateurs exogènes. Des premiers résultats peu concluants relatifs à ces composés (GA_3) et les risques de phytotoxicité dus à d'éventuels effets cumulatifs sont les principales raisons de ce choix. Les échantillons sont observés au cours de cultures primaires.

Un premier essai est réalisé sous forme factorielle : compositions minérales (K et M) x doses de charbon actif (0-5 et 20 g/l), regroupant donc au total 6 combinaisons (voir figure 2). Le traitement statistique des mesures d'allongement indique un effet significatif du milieu minéral au profit de la solution K : $F_{2,14} = 7,034$, $p < 0,01$, toutes doses de charbon confondues. L'influence du charbon actif est également significative : $F_{2,10} = 8,802$, $p < 0,001$, surtout sur milieu K ($F_{8,9} = 13,58$, $p < 0,001$) à la dose de 5 g/l, alors qu'une concentration de 20 g/l semble préférable pour la qualité des boutures sur milieu M. L'effet bénéfique de cette dernière combinaison sur l'élongation est mis en évidence lors d'un deuxième essai comparatif : milieu M avec ou sans 20 g/l de charbon actif, pour lequel le clone centenaire 03 est associé au clone juvénile 45.115 employé jusqu'alors. Deux analyses différées révèlent une augmentation significative de l'allongement Ac en présence de 20 g/l de charbon actif pour le clone 45.115 (figure 3a : $F_{2,13} = 31,18$, $p < 0,001$ et figure 3b : $F_{7,9} = 59$, $p < 0,001$) et occasionnellement pour le clone 03 (figure 3a, $F_{3,9} = 5,5$, $p < 0,025$).

Ces constatations nous ont incité à opter pour les milieux suivants : solution K et M avec respectivement 5 g/l (noté alors K5) et 20 g/l (noté M20) de charbon actif, que nous avons comparés, suite aux résultats précédents (§ 311), à la solution 2K additionnée de 5 g/l de charbon actif (noté 2K5). A cette fin, le clone centenaire 15 et le clone juvénile 45.115 ont été introduits ensemble, à deux reprises, sur les milieux K5, 2K5 et M20. Les mesures effectuées, clones confondus, révèlent la supériorité du milieu 2K5 pour l'allongement : $F_{3,47} = 3,652$, $0,025 < p < 0,05$. On note, d'autre part, sur l'allongement, un effet clonal au profit du clone 45.115 ($F_{3,48} = 37,5$, $p < 0,001$), ainsi qu'une interaction clone x milieu. Les résultats correspondants aux différentes combinaisons sont exposés figure 4.

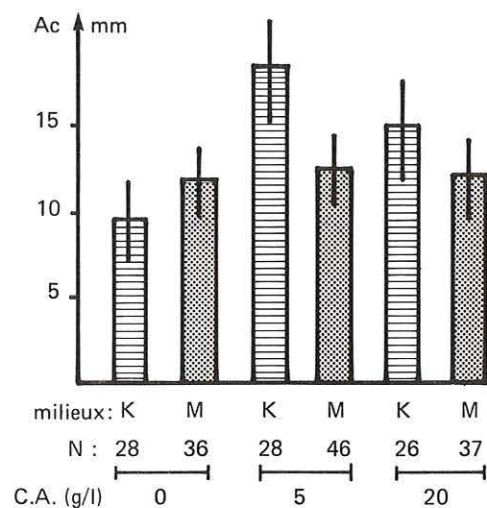


FIGURE 2
Influence des combinaisons
milieu minéral x dose de charbon actif (C.A.) sur la croissance Ac

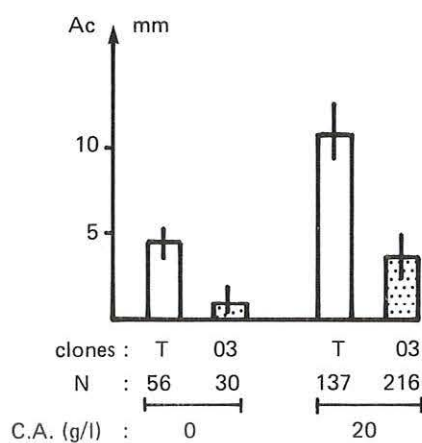


Fig. 3a - 1^{er} échantillon

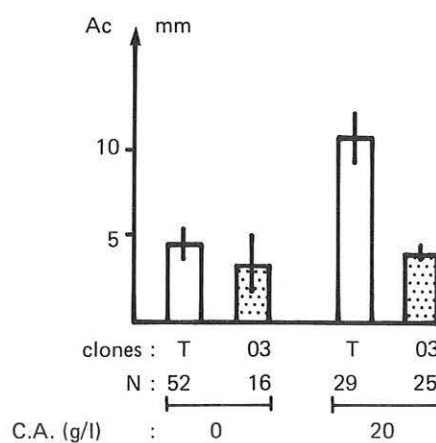


Fig. 3b - 2^e échantillon

FIGURE 3
Influence du charbon actif (C.A.) dans le milieu M
sur la croissance Ac des clones juvénile T (45.115) et centenaire 03

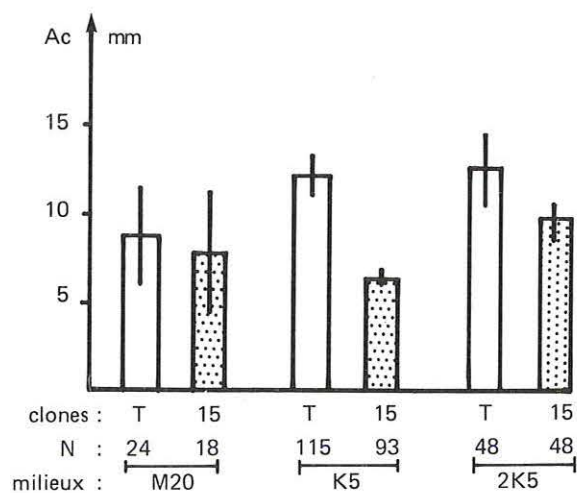
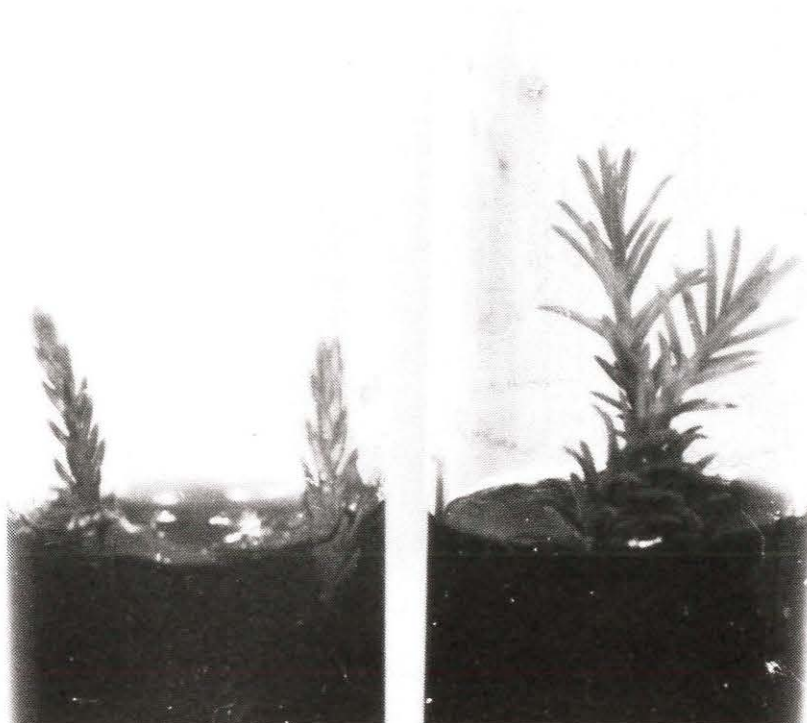


FIGURE 4
Croissances comparées des clones juvénile T (45.115)
et centenaire 15 sur milieux 2K5, K5 et M20 ($r = 2$)



Photos 2. — Influence du milieu d'allongement 2K5 à gauche et M20 à droite sur la morphologie de microboutures du clone 45.115

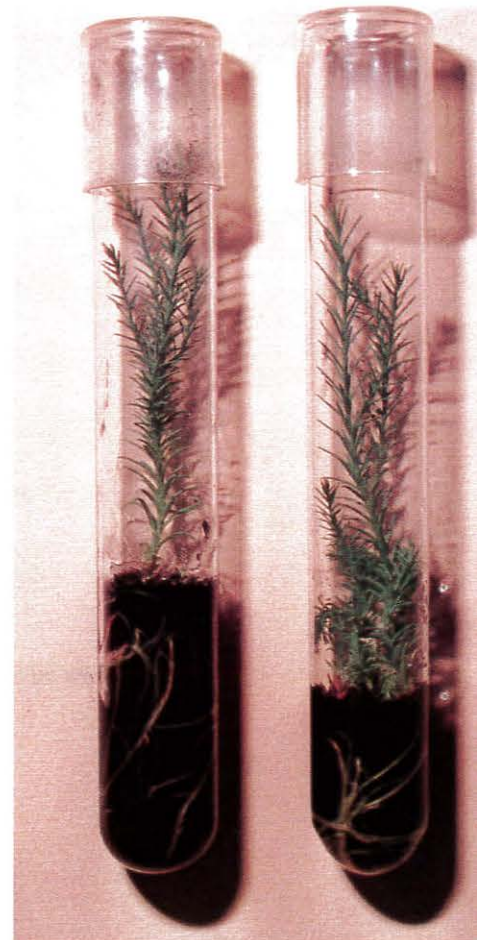


Photo 3. — Enracinements spontanés sur milieu d'allongement M20.

Certaines microboutures de clones juvéniles, après avoir atteint un développement de 3 à 4 cm, se sont enracinées spontanément sur milieu d'allongement. Ce phénomène semble plus important sur milieu M20 que sur K5 et 2K5. L'enracinement provoque une augmentation sensible de la taille des nouvelles feuilles formées particulièrement bien visibles lorsque les explants sont multipliés sur K5 et 2K5. En effet, comme déjà signalé (§ 311), la mise en culture sur ces compositions minérales dérivées du milieu Knop provoque une réduction notable de la morphologie foliaire des microboutures non racinées, contrairement au milieu M20 (voir photo n° 2).

33 - MILIEU DE RHIZOGENÈSE

La néoformation de racines adventives et leur développement ultérieur en un système racinaire fonctionnel et vigoureux est nécessaire au sevrage des boutures. A partir des tigelles produites *in vitro*, plusieurs techniques sont envisageables :

- enracinement des vitroplants en conditions horticoles traditionnelles (Boulay, 1977), comme cela est actuellement réalisé à l'échelle industrielle sur *Sequoia sempervirens*;
- système mixte incluant une induction rhizogène *in vitro*, suivie d'un allongement des racines ou « expression racinaire » hors tube, *in vivo* (Aitken-Christie J., 1984);

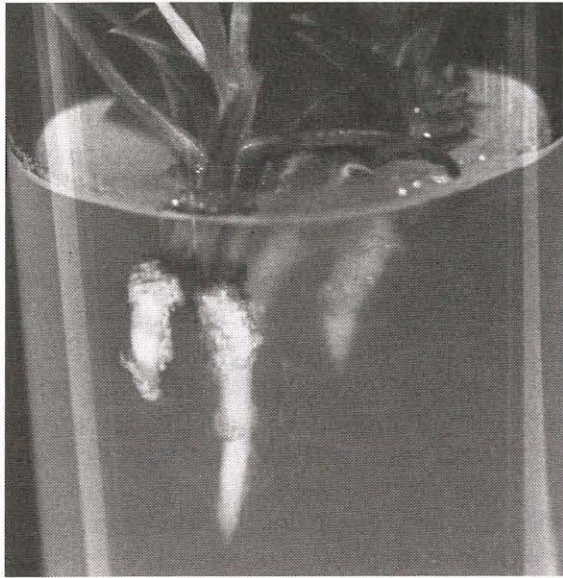


Photo 4. — Croissance racinaire sur MRE après induction sur MRI.

- rhizogenèse effectuée intégralement *in vitro*, généralement sur milieu gélosé, bien que d'autres substrats de diverses natures puissent également être utilisés (Boulay, 1984, Rancillac et al. 1982).

En ce qui nous concerne, nous retiendrons la technique d'enracinement *in vitro* sur milieu gélosé qui semble être plus adaptée à l'observation de l'enracinement des microboutures soumises à l'influence de différentes conditions de culture. Ces microboutures sont prélevées sur des pousses formées sur milieu d'allongement M20 à partir d'explants en culture primaire depuis 8 semaines. Le substrat K/2 (tableau n° 2) a été retenu comme milieu de base-témoin pour la rhizogenèse.

331 - SUBSTANCES DE CROISSANCE ET DÉRIVÉS

• les auxines

Les effets d'une auxine exogène sur l'enracinement dépendent de la nature du composé utilisé, de la dose employée et du temps de traitement. En fonction des espèces étudiées, comme le rappellent Bekkaoui et al. (1983), l'enracinement *in vitro* peut être obtenu sur milieu unique contenant de faibles doses d'auxine, ou nécessiter deux phases successives complémentaires : traitement inducteur en présence d'auxine, puis transfert des explants sur un milieu dit d'«expression racinaire», exempt d'hormone et permettant l'allongement des ébauches racinaires néoformées.

Des tentatives répétées afin d'obtenir la rhizogenèse sur milieu unique K/2 ont été vaines : des doses d'ANA de 0-0,01 et 0,1 mg/l, éventuellement combinées à 10 mg/l de vitamine D2 ou 0,01 mg/l de BAP n'ont pas permis l'enracinement des explants. En fonction du temps, ceux-ci jaunissent, puis dégénèrent. Des concentrations de 0,1 mg/l d'ANA provoquent à terme l'apparition de symptômes d'intoxication caractéristiques (décolora-

tions, déformations...). L'addition de BAP a un effet légèrement bénéfique sur l'aspect des boutures.

Ces observations décevantes nous ont incités à dissocier le traitement inducteur de la phase d'expression racinaire. Dans cette optique, deux techniques ont été utilisées : une induction rhizogène rapide, ou prolongée sur milieu de culture gélosé.

□ induction rhizogène rapide

La base des microboutures est trempée durant une période relativement courte dans une solution aqueuse d'auxine à des concentrations assez fortes, puis les explants sont repiqués sur milieu d'expression K/2. Sur notre matériel expérimental, des doses d'ANA de 50 à 100 mg/l appliquées durant 1-2 ou 3 heures semblent insuffisantes. Un traitement de 24 heures dans une solution titrant 100 mg/l d'ANA a permis d'obtenir 56 % de boutures enracinées (N = 24).

D'autre part, l'ANA, classiquement utilisée pour les Gymnospermes, a été comparée à l'AIB dans les conditions exposées tableau n° 7 (induction de 2 heures).

La substitution de l'ANA par l'AIB, ne paraît pas avantageuse quant au pourcentage d'enracinement, à l'image des résultats de Bekkaoui et al. (1983) sur *Sequoia sempervirens*. Utilisées sous forme de mélange 50-50, ces deux substances pourraient par contre provoquer un effet synergique bénéfique sur la rhizogenèse; cette éventualité demande à être confirmée par des temps de traitement inducteur plus longs (24 h).

TABLEAU N° 7
Effets comparés de ANA et AIB sur l'enracinement de microboutures Ra (%); Induction de 2 h en solution aqueuse (r = 4)

Auxines	N	Ra
ANA 100 mg/l.	130	14 %
ANA 50 mg/l + AIB 50 mg/l. . .	120	17 %
AIB 100 mg/l	88	11 %

Les différents essais d'induction rapide ont montré d'importantes variations du pourcentage et de la qualité d'enracinement en fonction de l'échantillon observé. L'appareil racinaire néoformé est assez fréquemment constitué de grosses racines peu nombreuses. Cette technique d'induction rapide peut provoquer conjointement des réactions anormales de certains explants sur milieu d'expression (morphogenèse anarchique, décolorations).

□ induction rhizogène prolongée

La phase d'induction rhizogène s'effectue sur milieu de culture gélosé généralement identique au milieu d'expression, mais contenant de l'ANA. L'effet de l'auxine est analysé à travers deux paramètres : la concentration et le temps de traitement.

Des doses de 0,5 à 1 mg/l d'ANA empêchent l'allongement des pointes racinaires bien visibles et, à terme, provoquent les phénomènes de

dégénérescence déjà évoqués que nous avons voulu éviter en transférant les microboutures sur milieu d'expression respectivement après 6 (ANA = 0,5 mg/l) ou 4 semaines (ANA = 1 mg/l). Les taux d'enracinement obtenus sont de 33 % pour un milieu inducteur avec 0,5 mg/l d'ANA et 67 % avec 1 mg/l d'ANA ($N = 24$, $\chi^2 = 2,66$, NS). Ultérieurement, l'ANA a été appliqué à des doses de 10 et 50 mg/l pendant 1, 2 ou 3 semaines ou à la concentration de 1 mg/l durant 2, 3 ou 5 semaines. Les résultats sont mentionnés figure 5a. Une analyse de variance indique un effet significatif sur le taux d'enracinement de la concentration en ANA ($F_6^2 = 112$, $p < 0,001$). Par contre le facteur «durée d'induction», dans les limites fixées, a moins d'importance. On constate un pourcentage global de 85 % d'enracinement sur le total de l'essai (figure 5b, $N = 12 \times 4$) pour une dose de 1 mg/l d'ANA, avec un maximum de 100 % après 3 semaines de traitement ($N = 12$) qui semble être le temps requis. Les concentrations de 10 et 50 mg/l d'ANA paraissent néfastes, ne permettant respectivement que 30 et 2 % d'enracinement ($N = 12 \times 4 = 48$) et provoquant des réactions de phytotoxicité vraisemblablement imputables à un excès d'ANA. Une teneur de 5 mg/l d'ANA dans le milieu d'induction pendant 3 semaines ne produit aucune amélioration sensible de l'enracinement par rapport au témoin ANA = 1 mg/l ($F_{12}^1 = 0,021$, NS).

FIGURE N° 5

Influence de la concentration en ANA sur le pourcentage d'enracinement Ra

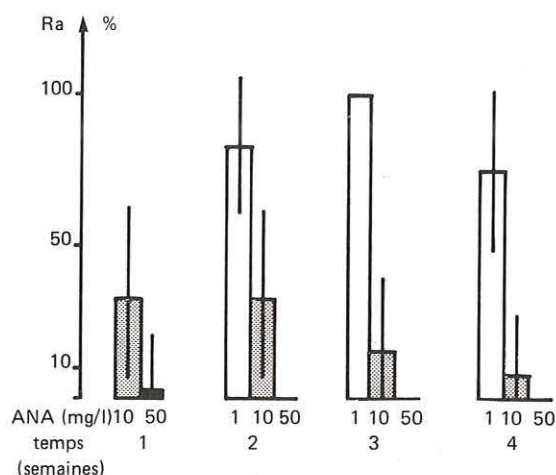


Fig. 5a - en fonction du temps d'induction ($N = 12$)

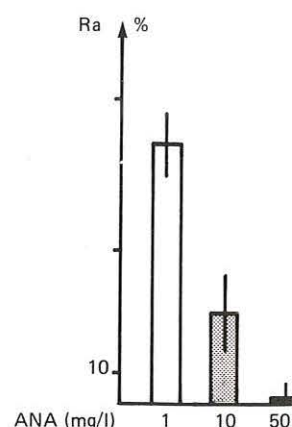


Fig. 5b - cumuls correspondants ($N = 12 \times 4$)

Suite à ces observations, nous avons opté pour un traitement inducteur rhizogène de 3 semaines sur milieu K/2 additionné de 1 mg/l d'ANA (phase d'induction), suivi d'un repiquage sur le même milieu K/2 dépourvu d'ANA (phase d'expression racinaire). Cette technique a été adoptée pour la suite de l'étude.

• les cytokinines

Yilmaz-Lentz (1984) constate un effet favorable des cytokinines (BAP), en association avec les auxines exogènes, sur l'enracinement de plantules de *Sequoiadendron* néoformées à partir de section d'hypocotyles. Pour notre part, nous avons noté également des cas d'enracinements consécutifs à un traitement avec cytokinines (tableau n° 4 : BAP 0,5 ou 0,1 mg/l). A partir de ces observations, des doses de 0,01 à 0,1 mg/l de BAP ont été ajoutées dans le milieu d'induction MRI. Nous constatons sur la figure n° 6 un effet bénéfique bien que non significatif ($F_4^2 = 1,058$, NS) pour 0,01 mg/l de BAP par rapport au témoin (BAP = 0). La concentration 0,1 mg/l paraît par contre trop forte.

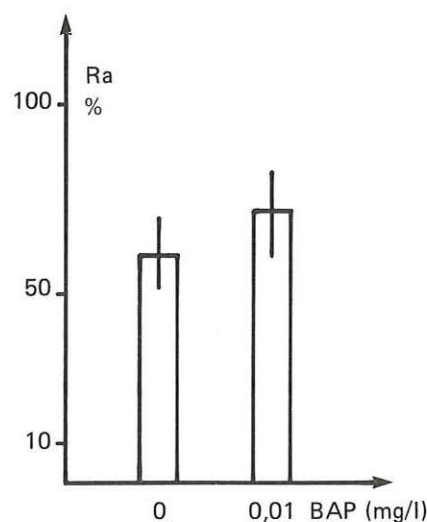


FIGURE 6
Influence de la BAP sur le
pourcentage d'enracinement
Ra (N = 60, r = 3)

• la vitamine D2

Moncousin et Gaspar (1983) notent une influence positive de la vitamine D2, ou ergocalciférol, employée en association avec l'ANA sur l'enracinement de l'artichaut. Dans nos conditions, sur un matériel d'étude bien différent, les résultats consécutifs à des traitements inducteurs de 10 et 50 mg/l de vitamine D2 associée à 1 mg/l d'ANA ont été décevants (N = 96, r = 6).

332 - CONCENTRATION DE LA SOLUTION MINÉRALE

La concentration, autrement dit la salinité, d'un équilibre minéral donné peut influencer l'enracinement in vitro de certaines espèces (Bonga, 1982, David, 1982). Il est généralement reconnu que des solutions trop riches inhibent la rhizogenèse et entraînent des dégénérescences de l'explant.

En ce qui nous concerne, nous avons voulu comparer le milieu minéral initialement utilisé, K/2 (14,8 meq) à la même composition non diluée K (29,6 meq). Les figures n° 7 illustrent l'effet bénéfique sur le pourcentage d'enracinement de la solution K par rapport à K/2, surtout pour une durée d'induction de 6 semaines avec ANA = 0,5 mg/l ($\chi^2 = 12,97$,

$p < 0,001$, $N = 24$). Des concentrations supérieures (2K) sont excessives et nuisent à la rhizogenèse, tant du point de vue quantitatif que qualitatif (cals, hypertrophies...).

FIGURES N° 7
*Influence de la concentration du milieu minéral
sur le pourcentage d'enracinement Ra*

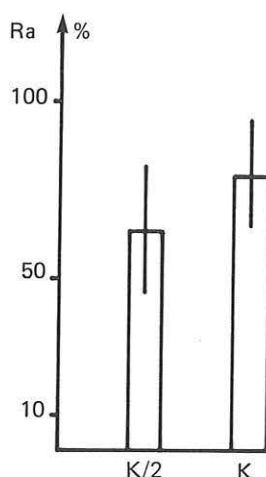


Fig. 7a - Technique habituelle : 3 semaines de culture sur MRI (ANA = 1 mg/l) avant repiquage sur MRE ($N = 12 \times 2$, $r = 2$).

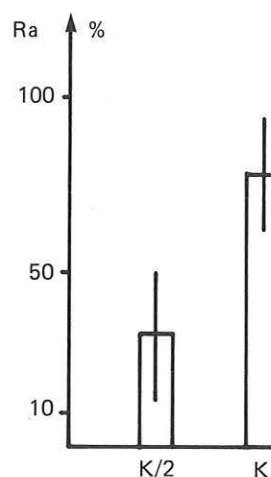


Fig. 7b - Variante : 6 semaines de culture sur MRI avec ANA = 0,5 mg/l avant repiquage sur MRE ($N = 12 \times 2$, $r = 2$).

333 - SACCHAROSE

Lors d'essais préliminaires, une nette amélioration du taux d'enracinement a été obtenue en abaissant graduellement la quantité de saccharose du milieu de 30 g/l à 5 g/l, à l'exemple d'autres auteurs travaillant également sur des Gymnospermes (Reynoird, 1983; Rancillac et al. 1982). Cette dernière concentration de 5 g/l de saccharose, adoptée pour le milieu inducteur, a permis d'obtenir des taux d'enracinement élevés mentionnés précédemment. L'effet inhibiteur des quantités trop importantes de saccharose sur l'enracinement est mis en évidence dans l'histogramme de la figure n° 8 ($\chi^2 = 15,09$, $0,001 < p < 0,01$, $N = 24$). Outre une baisse sensible du taux d'enracinement, un excès de saccharose (45 et 60 g/l) provoque un dépérissement des boutures. Des essais ultérieurs ont montré que le sucre agit surtout durant la phase d'induction, en présence d'ANA. Cependant, sur milieu d'expression, des doses de 30 g/l semblent stimuler la croissance de l'explant (voir photo n° 5).

334 - CHARBON ACTIF

L'incorporation de charbon actif à des doses de 5 et 20 g/l dans le milieu d'induction inhibe de façon significative l'enracinement des boutures sur milieu d'expression ($\chi^2 = 14,4$, $p < 0,001$, $N = 24$). Le charbon pourrait avoir, par contre, un effet bénéfique sur l'allongement des boutures en

FIGURE N° 8
Influence de la concentration en saccharose
sur le pourcentage d'enracinement Ra;
culture de six semaines sur MRI avec ANA 0,5 mg/l,
avant repiquage sur MRE (N = 24)

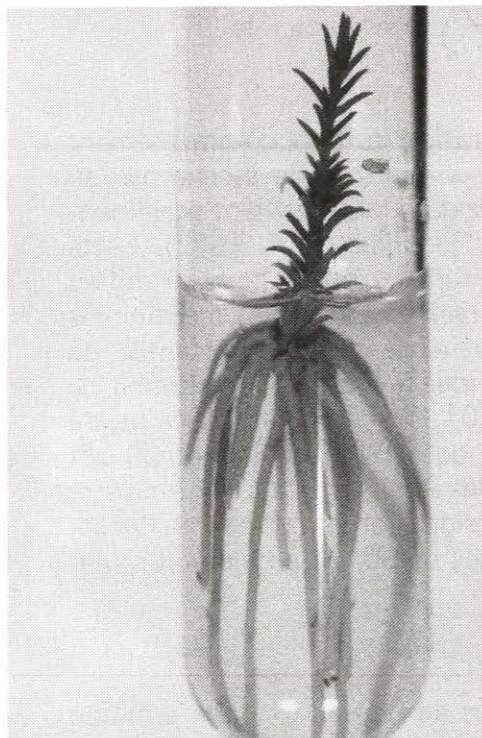
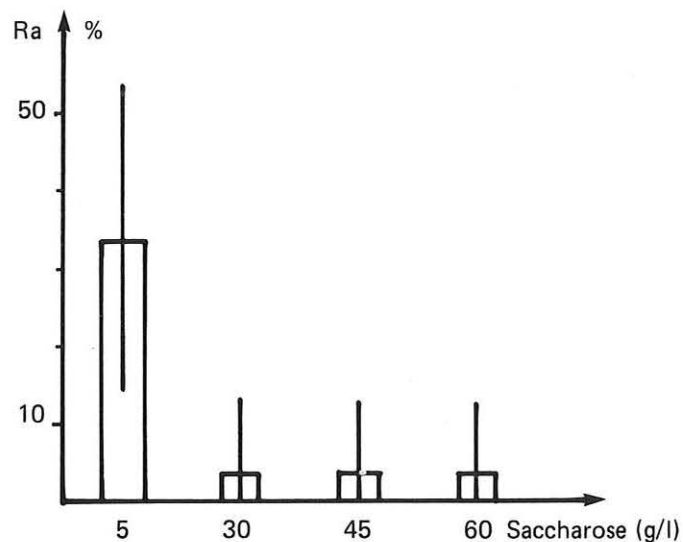


Photo 5. — Appareil racinaire bien développé sur MRE (30 g/l. de saccharose).

association avec 0,1 ou 1 mg/l d'ANA. Ces observations renforcent l'hypothèse selon laquelle le charbon actif se comporterait comme rétenteur de l'ANA (Boulay, 1984).

Ajouté au milieu d'expression à raison de 5 g/l, le charbon n'a aucun effet bénéfique sur le pourcentage d'enracinement des boutures au bout de six semaines ($F_{18}^1 = 0,034$, $p < p_0$, $r = 10$, $N = 120$).

335 - CONSISTANCE DU MILIEU

L'influence de la consistance du milieu d'induction a été testée avec des doses de gélose de 7-3,5 et 0 g/l (pour cette dernière concentration, les explants sont repiqués sur un substrat de polypropylène, chimiquement neutre, qui joue le rôle de support physique). La phase liquide (0 g/l) paraît contre-indiquée : diminution du taux d'enracinement, dépréciation de la qualité de l'explant, alors qu'on observe peu de différence entre les variantes 3,5 et 7 g/l de gélose.

TABLEAU N° 8
Composition des milieux de culture adoptés
Les quantités sont exprimées en mg/l

Milieux Composants	Milieux de multiplication MM		Milieux d'allongement MA		Milieux de rhizogenèse	
	X2K	XM	2K5	M20	induction MRI	expression MRE
NH ₄ NO ₃		825		825		
KNO ₃	500	950	500	950	250	250
CaCl ₂ , 2H ₂ O		220		220		
MgSO ₄ , 7H ₂ O	500	185	500	185	250	250
KH ₂ PO ₄	500	85	500	85	250	250
Ca(NO ₃) ₂ , 4H ₂ O	2000		2000		1000	1000
FeSO ₄ , 7H ₂ O	27,8	13,9	27,8	13,9	13,9	13,9
Na ₂ EDTA	37,3	18,6	37,3	18,6	18,6	18,6
MnSO ₄ , 4H ₂ O	11,2	11,2	11,2	11,2	11,2	11,2
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	4,3	4,3	4,3	4,3	4,3	4,3
H ₃ BO ₃	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1
KI	0,41	0,41	0,41	0,41	0,41	0,41
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012
AlCl ₃ , 6H ₂ O	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
Myo-inositol	50	50	50	50	50	50
Glycocolle	2	2	2	2	2	2
Pyridoxine	1	1	1	1	1	1
Acide nicotinique	1	1	1	1	1	1
Thiamine	1	1	1	1	1	1
BAP	0,1 à 0,5	0,1 à 0,5			0,01	
ANA	0,01	0,01			1	
Saccharose	30.10 ³	30.10 ³	30.10 ³	30.10 ³	5.10 ³	5.10 ³ ou 30.10 ³
Charbon actif (MERCK 2186)			5.10 ³	20.10 ³		
Gélose (Bacto-Agar-DIFCO)	7.10 ³	7.10 ³	7.10 ³	7.10 ³	7.10 ³	7.10 ³



Photo 6 - Microbouturage du séquoia géant : échantillon particulièrement rhizogène (100 % d'enracinement N = 12).

Commentaires

Les résultats exposés ont été établis dans des conditions de culture bien définies, mais malgré tout susceptibles d'être perturbées par l'action de facteurs difficilement contrôlables : variations de pH, hydrolyse de certains composés à 120°C, échanges gazeux... Cette remarque, applicable à bon nombre d'études à partir de cultures *in vitro* mérite néanmoins d'être rappelée.

L'influence des éléments dits trophiques, sur les différents processus d'organogenèse évoqués, a été plusieurs fois mise en évidence. Si le rôle qualitatif de ces composés en fonction des quantités imposées paraît le plus évident, leur incidence sur les caractéristiques physico-chimiques du milieu de culture (pH, salinité, pression osmotique, potentiel hydrique, etc...), bien que difficilement estimable, ne doit pas être négligée pour autant. Le saccharose, par exemple, outre la source énergétique qu'il représente, peut jouer le rôle d'osmoticum susceptible de modifier, en fonction de sa concentration, les échanges explant-milieu et d'inhiber par là même l'effet de certaines substances telles que les phytorégulateurs exogènes (ANA). Cette hypothèse permettrait d'interpréter le fait que l'influence du saccharose sur l'enracinement soit surtout sensible en phase d'induction rhizogène, en présence d'ANA.

Dans l'état actuel, les analyses effectuées successivement sur milieu dit de multiplication MM, milieu d'allongement MA et milieux de rhizogenèse MRI et MRE, permettent de mieux appréhender l'influence de certains composants du substrat de culture et d'améliorer les compositions initiales. Les nouvelles formulations figurent tableau n° 8. Pour ces trois types de milieux, l'origine des explants a été précisée.

Contrairement aux phases de multiplication ou d'allongement, la rhizogenèse est difficilement réalisable à partir de cultures primaires avec la technique adoptée. Un séjour de plusieurs semaines sur milieu d'élongation est nécessaire avant repiquage sur milieu d'induction rhizogène. Il semble même qu'une phase de culture sur milieu de multiplication enrichi en BAP avant l'introduction sur milieu d'allongement soit favorable à l'enracinement ($F_6^1 = 18,4$, $0,001 < p < 0,01$). Sur milieu d'induction rhizogène, l'ANA provoque à la base des explants d'importantes perturbations anatomiques (voir photo n° 13) dont l'intensité, la conformation et le devenir varient fortement d'une bouture à une autre. L'apparition d'ébauches racinaires bien visibles sur MRI est variable, à l'image de leur évolution ultérieure sur milieu MRE (cinétiques racinaires plus ou moins différées).

La séquence proposée dans l'ordre chronologique suivant : milieu de multiplication (trois semaines), milieu d'allongement (M20) (huit semaines), milieu d'induction (trois semaines), puis d'expression racinaire, s'identifie à la technique préconisée par Bekkaoui et al. (1983) pour le *Sequoia sempervirens*. Des essais destinés à simplifier cette démarche en provoquant, par exemple, l'enracinement et l'élongation sur un même milieu n'ont pas abouti aux résultats escomptés.

Aspects anatomiques

Photo 11 - Coupe transversale de la base d'une microbouture avant l'introduction en culture primaire; l'implication de la partie décurrente des feuilles dans la formation de l'axe central apparaît nettement, surtout au niveau du système vasculaire; on note la présence d'un gros canal sécréteur dans le mésophylle de chacune des quatre feuilles.

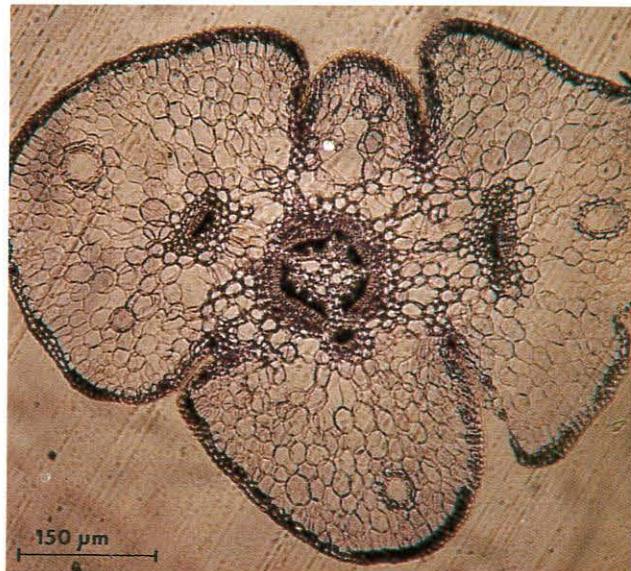


Photo 12 - Section transversale d'un rameau d'ordre 1 d'un semis d'une saison de végétation; les cernes visibles au niveau du xylème renforcent l'hypothèse d'une activité cyclique.

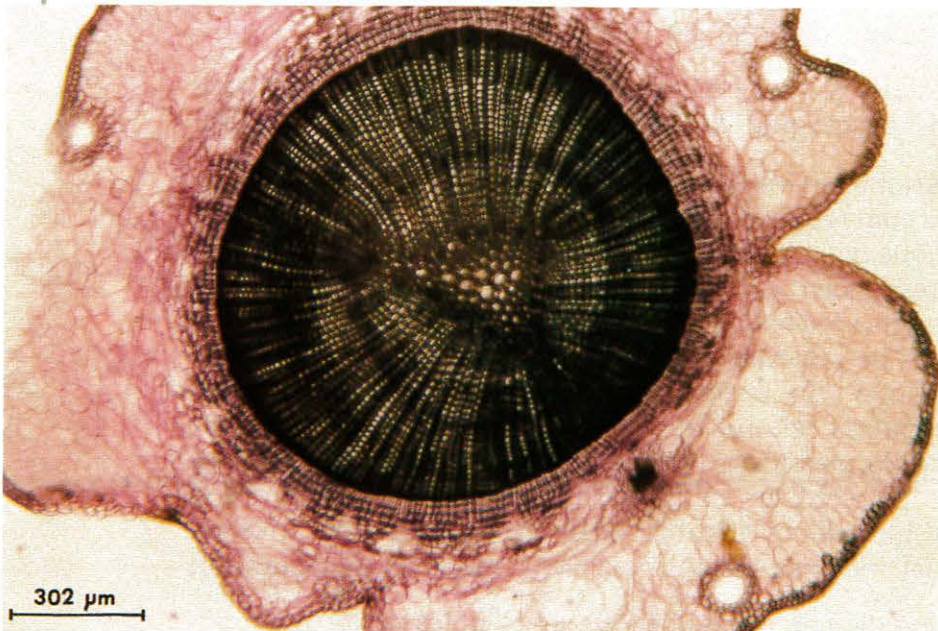


Photo 13 - Bouversements anatomiques de la base d'une bouture enracinée après induction à l'ANA; on distingue nettement le système conducteur de la tige (en coupe transversale) et celui de la racine (coupe longitudinale).



4. aspects physiologiques

Les différentes observations précédemment exposées dénotent une hétérogénéité de comportement au sein de chaque lot de microboutures, exprimée notamment par l'amplitude des intervalles de confiance des histogrammes. De plus, les introductions différées, sur un même milieu, d'échantillons d'origine déterminée (répétitions) montrent de grosses variations de capacités morphogénétiques d'une mise en culture à une autre. Les fluctuations en fonction de la date de prélèvement des explants sur le pied-mère sont particulièrement marquées en ce qui concerne l'aptitude à l'enracinement puisque les pourcentages relevés au bout de six semaines sur MRE peuvent varier de 0 à 100 % ($N \geq 12$).

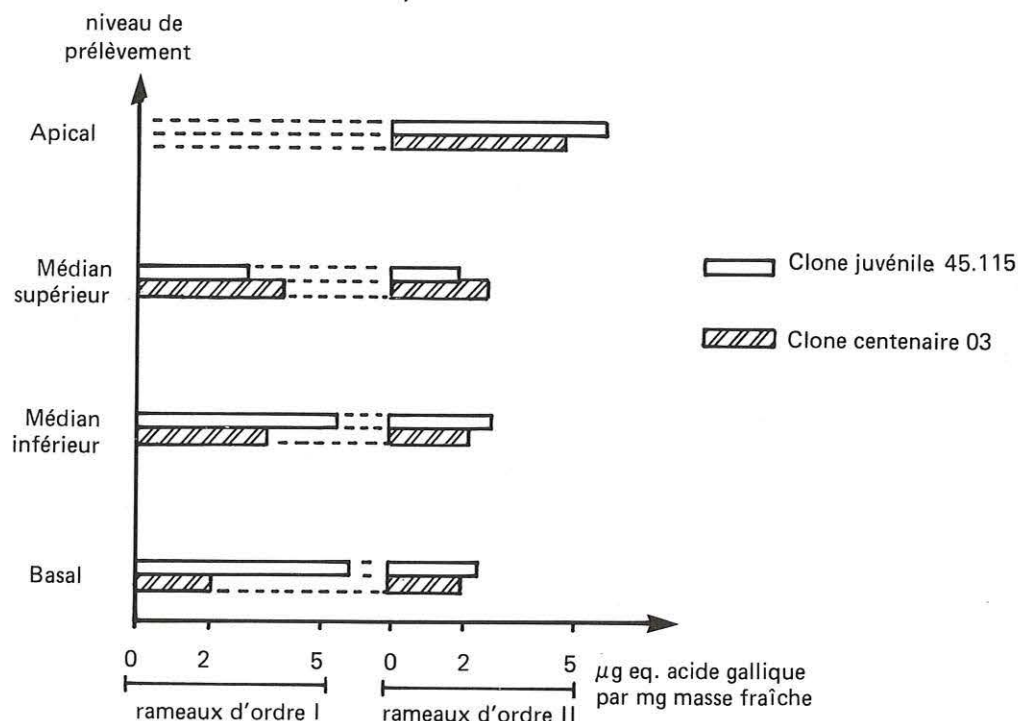
Ces faits nous ont incités à nous intéresser à différents effecteurs physiologiques susceptibles d'expliquer les variations morphogènes observées.

Berthon (1985) a récemment vérifié que le processus de rhizogenèse pouvait être caractérisé, comme pour d'autres espèces (Moncousin et Gaspar, 1983) par une cinétique de l'activité peroxydasique. De forts pourcentages d'enracinement correspondent à une amplitude importante du pic d'activité de ces enzymes, et inversement. Des différences d'aptitude rhizogène en fonction des dates de prélèvement correspondent à des modifications de profil peroxydasique. En outre, cet auteur a également confirmé l'existence d'une variation relative d'intensité peroxydasique correspondant à l'architecture du pied-mère : gradient croissant basipète constitué en grande partie de peroxydases solubles basiques chez les jeunes ortets à type architectural bien défini et orthotrope; les résultats étant inversés sur le vieux matériel mobilisé plagiotrope (Bon, résultats non publiés).

D'autre part, l'analyse des composés phénoliques solubles renforce l'hypothèse d'une relation entre le degré de ramification par rapport à l'axe principal de l'ortet *in situ* et la teneur en composés phénoliques. Des dosages ont été réalisés, sur le clone juvénile 45.115 et le clone mature 03; les résultats sont présentés dans la figure n° 9. Pour les sujets juvéniles, systèmes architecturaux à ramifications bien hiérarchisées, on observe dans les extrémités d'axe d'ordre 1 un gradient basipète de la teneur en phénols. Les mesures effectuées sur des ramifications d'ordre 2 correspondantes ne révèlent aucune différence significative, quelle que soit la position du rameau. En revanche pour le clone mature on constate l'existence d'un gradient croissant acropète pour les axes d'ordre 1 et d'ordre 2.

L'étude de l'évolution des composés phénoliques solubles des explants au cours de leur culture *in vitro* a été menée sur le clone juvénile 45.115 et le clone mature 03. Les dosages répétés effectués indiquent là encore une étroite relation entre l'aptitude à l'organogenèse et les teneurs en polyphénols, illustrée figures n° 10. Le suivi des explants sur milieu d'allonge-

FIGURE N° 9
Variation de la teneur en polyphénols en fonction des différents
niveaux de prélèvement sur l'ortet.



ment, puis milieu de rhizogenèse (induction puis expression) révèle que la teneur initiale en composés phénoliques des microboutures influe sur leur devenir organogène *in vitro*. L'intensité de l'organogenèse (caulogenèse, rhizogenèse) semble liée à des teneurs invariablement basses des composés phénoliques sur milieu d'allongement M20. La rhizogenèse s'accompagne de changements et variations qui, d'un point de vue chronologique, paraissent inversés par rapport à ceux de l'activité peroxydasique. Ce phénomène a déjà été constaté par Druart et al. (1982) sur le pommier. Une cinétique plus fluctuante de ces composés phénoliques sur milieu d'allongement M20 correspond à une croissance faible suivie d'un pourcentage d'enracinement bas. Ces caractéristiques de la partie allongée de l'explant *in vitro* introduite sur milieu de rhizogenèse dépendent de la concentration en composés phénoliques de la partie sous-jacente formée sur le pied-mère (Fadl et al. 1979). L'organogenèse de l'explant *in vitro* paraît être stimulée par une teneur en polyphénols initialement forte, puis décroissant dans les premières phases de la culture sur milieu d'allongement.

La relation entre teneur en composés phénoliques et potentialités organogènes des explants paraît applicable à tous les échantillons observés en culture *in vitro* quelle que soit leur origine. Nous noterons que pour les critères observés, les caractéristiques des clones matures, généralement moins réactifs, s'apparentent à celles du clone juvénile à certaines périodes (figure 1c et 10b).

FIGURE 10
Variation de la teneur en composés phénoliques solubles
sur milieu d'allongement M20 et de rhizogenèse

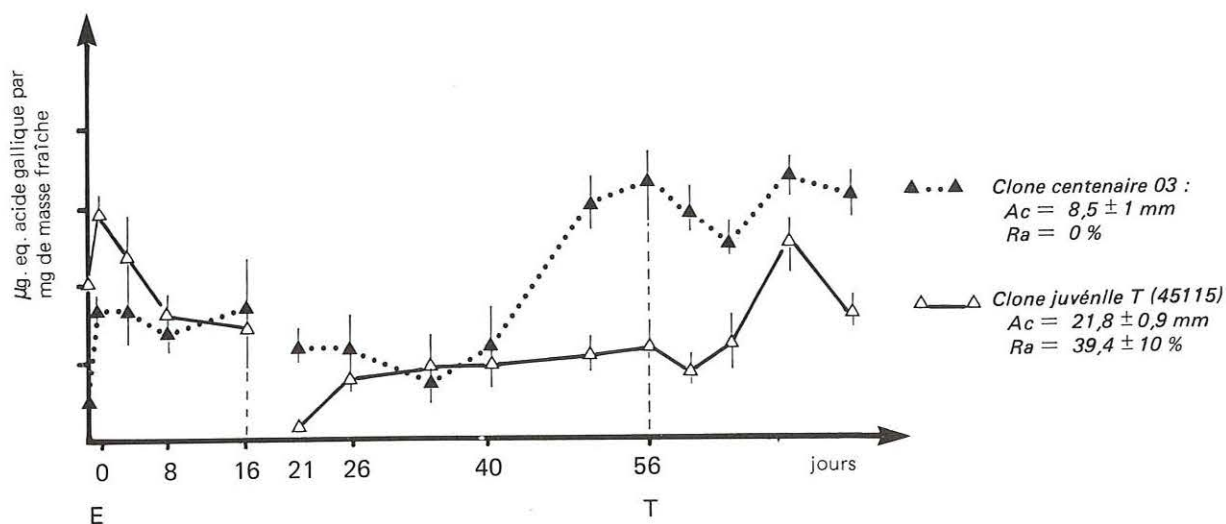


Fig. 10a - 1er échantillon

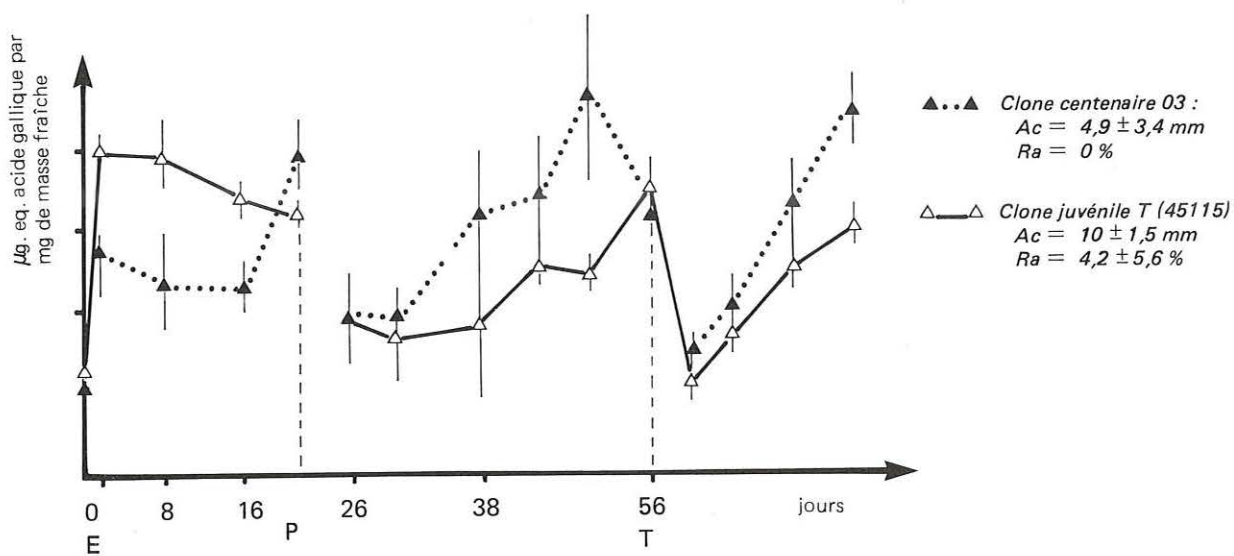


Fig. 10b - 2ème échantillon

Ac : accroissement moyen
E : excision de l'explant
P : apparition de la nouvelle pousse sur M20
Ra : % d'enracinement
T : transfert sur MRI de la pousse formée sur M20
Effectifs :
• par dosage : $N = 3 \times 3$
• pour Ra : $N = 24$

Commentaires

La culture *in vitro* de microboutures implique l'excision de fragments végétatifs du pied-mère. L'effet blessure résultant peut avoir des conséquences plus ou moins importantes sur l'état physiologique de l'explant et, par la suite, influencer sur son comportement ultérieur (Tran Thanh van, 1981). Ce phénomène est aisément perceptible sous forme de brunissement lors de la mise en culture de méristèmes en fonction de l'activité des points végétatifs. Le traumatisme causé entraîne une augmentation du taux de polyphénols (figure 10), une stimulation du système polyphénoloxydasique, et de la teneur en composés oxydés (quinones, tanins,...). Ces réactions métaboliques, malgré les précautions prises pour les minimiser (travail en milieu réducteur, antioxydants, froids, semi-obscurité) perturbent l'analyse de l'état physiologique du pied-mère à travers les explants, mais traduisent de façon réaliste certaines perturbations endogènes inhérentes à l'excision de l'explant précédant son introduction en culture primaire.

Sur un plan analytique, une approche plus qualitative des différents régulateurs observés paraît souhaitable. La distinction entre peroxydases solubles basiques (théoriquement impliquées dans le métabolisme auxinique), acides (élaboration des parois), orthodiphénols (protecteurs en particulier des AIA oxydases) et de leurs conjugués, peut être intéressante pour caractériser une organogenèse particulière. Les variations d'état physiologique correspondantes, observées à l'intérieur d'un clone quels que soient ses antécédents, juvénile ou mature, discréditent l'utilisation des effecteurs du métabolisme auxinique comme marqueurs fiables du phénomène de vieillissement chez *Sequoiadendron*.



5. hyperhydrie

Des cas d'hyperhydrie, ou vitrification, ont été constatés lors des premiers essais de mise au point des milieux de culture. L'état vitreux est une forme de dégénérescence abondamment décrite (Bornamn et Vogelmann, 1984), qui se manifeste relativement rapidement. Ce phénomène peut être conditionné par la nature du milieu de culture en fonction, semble-t-il, de l'état physiologique de l'explant au moment de son introduction. Faute de pouvoir analyser correctement ce dernier paramètre, l'énumération non exhaustive de certains éléments susceptibles de favoriser l'hyperhydrie sur des microboutures de *Sequoiadendron* peut être profitable.

51 - DONNÉES RELATIVES AU MILIEU DE CULTURE

• composition minérale

Nous avons pu vérifier que des solutions riches en éléments minéraux, comme le milieu de Murashige et Skogg (1962), non dilué, ont tendance à augmenter les risques de vitrification. Notons que l'effet de l'ion ammonium dénoncé par Daguin (1984) sur *Salix babylonica* n'est pas un facteur prépondérant puisque le phénomène a été observé sur le milieu de Knop concentré 1 fois (2K). Outre la composition qualitative, mise à profit dans certains cas pour obtenir une réversion de l'état vitreux, une salinité globalement élevée du milieu paraît être également un facteur causal.

• cytokinines

Sur notre matériel d'étude, l'effet des cytokinines est très variable : des concentrations excessives (1 mg/l ou plus), associées à des solutions minérales riches, favorisent l'hyperhydrie.

• charbon actif

Initialement, les 20 g/l de charbon actif du milieu M20 étaient incorporés avant autoclavage. La proportion d'explants vitreux est, dans ce cas, relativement élevée (tableau n° 9). Conjointement, nous avons constaté que l'addition de charbon actif avant stérilisation entraîne une perte de consistance du milieu gélosé M. Des mesures de pH après autoclavage révèlent une acidification globale effective plus importante due au charbon (environ une unité de pH). D'autre part, les milieux de culture des échantillons vitreux sont plus acides (tableau n° 10). L'incorporation du charbon actif après autoclavage évite la liquéfaction de la phase gélosée et, par la même occasion, réduit l'apparition de plants vitreux; les pH correspondants sont supérieurs (tableau n° 11).

HYPERHYDRIE OU « VITRIFICATION » SUR MILIEU M20

TABLEAU N° 9

*Vitrification en fonction de l'origine des explants.
Le charbon actif a été incorporé dans le milieu avant l'autoclavage*

Explants	Clone juvénile	Clone centenaire
non vitreux	31	18
vitreux	17	28
Totaux	48	46

TABLEAU N° 10

*Mesures de pH des milieux M20 après
3 mois de culture, en relation avec l'état
vitreux (N = 15).*

Le charbon actif a été ajouté dans le milieu
avant l'autoclavage

pH du milieu	Explants vitreux	Explants non vitreux
Surface (- 1,5 cm) . . .	4,82 ± 0,14	5,26 ± 0,17
Fond (+ 1 cm) .	5,18 ± 0,13	5,45 ± 0,24

TABLEAU N° 11

*Comparaison de pH du milieu M20
en fonction de la technique d'incorporation
du charbon actif (C.A) (N = 10)*

C.A incorporé pH du milieu	avant autoclavage	après autoclavage
Surface (-1,5 cm)	5,69 ± 0,19	5,95 ± 0,06
Fond (+ 1 cm) .	5,85 ± 0,11	6,06 ± 0,07

TABLEAU N° 12

*Dosages de Na et K dans les explants après mesure au spectrophotomètre de flamme
(en % de masse sèche)*

Explants	avant introduction in vitro		après 3 mois de culture in vitro			
	clone juvénile	clone centenaire	clone juvénile		clone centenaire	
			non vitreux	vitreux	non vitreux	vitreux
K	7,8	9,2	27,6	36,2	47,0	47,0
Na.	0,186	2,280	0,435	0,301	1,110	0,290
K/Na	41,9	4,0	63,4	120,3	42,1	162,1

52 - DONNÉES RELATIVES AUX EXPLANTS

Les observations réalisées sur les échantillons de microboutures affectés par le phénomène de vitrification montrent :

- que la position de l'explant sur le milieu de culture paraît avoir une importance : dans certaines conditions précisées (§ 313), les boutures en position horizontale sont préférentiellement affectées par l'hyperhydrie. L'influence de la surface de contact avec le milieu peut être évoquée (Bornman et Vogelmann, 1984).
- que l'hyperhydrie concerne aussi bien le matériel mature que le juvénile (tableau n° 9).
- que le rapport K/Na, augmenté par 3 mois de culture *in vitro* sur milieu M20, est nettement plus élevé dans les explants vitreux (tableau n° 11).
- pour un même clone, des proportions variables de boutures vitreuses en fonction de la date d'introduction en culture primaire des échantillons.

Commentaires

Nos observations appuient certains travaux antérieurs (Paques et Boxus, 1985; Daguin, 1984; Walker et al., 1984) à propos de substrats de culture riches et pas assez consistants du fait d'un pH trop acide. Cette acidité est due présentement à l'incorporation de 20 g/l de charbon actif avant autoclavage; après quelques semaines, le raffermissement de la matrice par évaporation provoque une réversion assez brutale du type vitreux. Néanmoins, l'hétérogénéité remarquée sur l'ensemble de l'échantillon, ou individuellement avec la coexistence sur un même explant de pousses atteintes alors que d'autres paraissent non affectées, est révélatrice de l'influence de l'état physiologique. La sensibilité de la microbouture vis-à-vis du milieu de culture dépend en grande partie de sa perméabilité, passive ou active (Tran Thanh van, 1981). Dans cette perspective, une analyse individuelle de la différence de pH entre l'explant (technique DMO C¹⁴; Gendraud, 1981) et son milieu de culture pourrait être fort instructive.

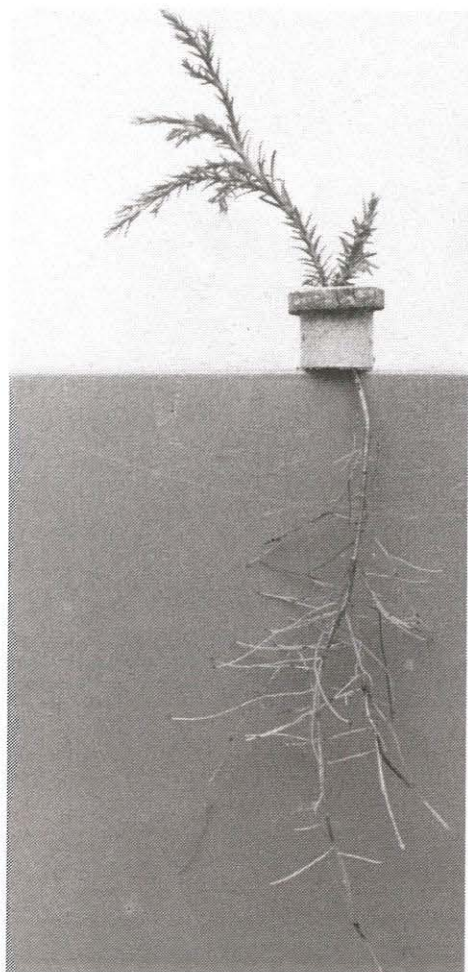


Photo 7. — Sortie de tube : morphologie d'une microbouture racinée en culture sur caisson de brouillard nutritif.

6. sortie de tube acclimatation

Les microboutures de 2 à 3 cm de haut enracinées sur MRE sont repiquées en salle climatique sur caisson nutritif («rhizotron» Monteouis, 1984) ou sur substrat horticole (perlite, tourbe, sable). Une enceinte transparente assure quelque temps au niveau de l'appareil caulinaire l'humidité nécessaire à une acclimatation réussie. L'examen de la partie racinaire montre une dégénérescence partielle, voire totale, des racines formées *in vitro* qui sont remplacées par de nouvelles, plus adaptées aux conditions du caisson ou substrat horticole. La croissance de la bouture acclimatée montre une morphologie foliaire bien développée et de nombreux bourgeons, caractéristiques de formes juvéniles. On note un degré de plagiotropie plus ou moins marqué en fonction des individus et l'absence de véritables préséances apicales.

Commentaires

L'acclimatation, puis le repiquage de boutures en mottes Melfert paraissent aisés. Comme signalé pour d'autres espèces (Boulay, 1984), les racines formées *in vitro*, ne semblent pas adaptées aux conditions naturelles. Elles sont néanmoins à l'origine des régénérations ultérieures. Sur un plan pratique, la phase d'allongement racinaire pourrait avantageusement se réaliser en conditions *in vivo*.

●

Photo 8. — Vitroplants
sevrés, repiqués en mottes
Melfert.



7. discussion générale

Du fait du nombre volontairement restreint de paramètres et combinaisons étudiées, la technique de microbouturage exposée est susceptible d'être améliorée ou adaptée selon les besoins. Néanmoins, les modalités de culture établies permettent, dès à présent, de cultiver le séquoia géant *in vitro* à différentes fins : auto-entretien de clones, sub-cultures, allongement, enracinement..., à l'image du *Sequoia sempervirens*, essence malgré tout plus réactive.

Le nombre de pousses obtenues sur milieux enrichis en cytokinine peut paraître décevant, ou du moins ne pas justifier l'appellation consacrée de milieu de multiplication. A ce propos, des examens sous loupe binoculaire ont révélé l'absence de néoformations et attribuent les dénombrements effectués à l'expression morphogène de bourgeons préexistants. Leur développement en pousses axillaires peut également être stimulé par décapitation de la tigelle sur milieu d'allongement (voir photo n° 10).

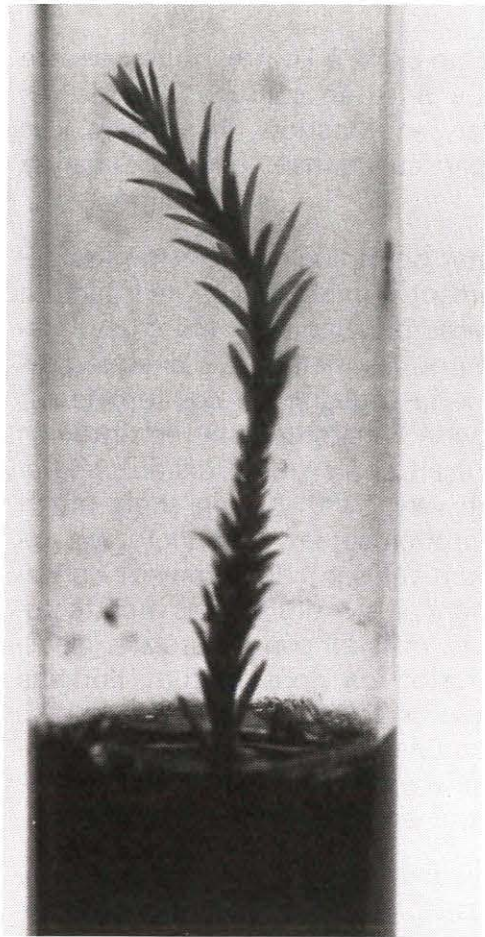


Photo 9. — Polymorphisme foliaire au cours de la croissance sur milieu d'allongement.

Notre matériel d'étude, clone 45.115 compris, paraît trop différencié pour répondre favorablement à une sollicitation exogène destinée à induire un bourgeonnement adventif. Yilmaz-Lentz (1982), sur des plantules de la même espèce constate, dans ces conditions, que seuls des fragments d'hypocotyles sont susceptibles de néoformer des bourgeons.

Le matériel expérimental est exclusivement constitué de clones destinés à l'analyse de la micropropagation clonale. Les caractéristiques respectives de ces clones, potentialités organogènes notamment, ont fait l'objet d'une étude antérieure *in vivo* qui a permis de mieux les définir (Monteuuis, 1984). En conditions *in vitro*, des observations parallèles ont permis de constater que le clone 45.115, principalement utilisé, a un comportement représentatif des clones de même origine (ortets juvéniles) qui semblent, malgré tout, moins réactifs que des semis âgés de 6 mois. Si l'effet de l'âge chronologique, par référence à la tête de clone, apparaît dans les

premiers stades de culture *in vitro*, des relevés répétés confirment que l'aptitude à la multiplication végétative des explants dépend avant tout de leur état physiologique (Boulay 1984, David 1982, Dormling et Kellerstam, 1981). Cet état est sujet à fluctuations comme le témoignent les divers indices morphogénétiques : phyllogénèse (voir photo n° 9), aptitude à l'organogénèse..., ainsi que les dosages biochimiques réalisés.

De ce point de vue, la présente étude menée en conditions constantes confirme les présomptions formulées *in vivo* où l'influence des paramètres d'environnement peut être impliquée. L'effet de ces changements d'activité physiologique au cours du temps, communément évoqué sous le terme de variations saisonnières (voir Davies, 1984), paraît primordial en ce qui concerne la multiplication végétative du *Sequoiadendron*. Dans l'état actuel des choses, l'origine et les caractéristiques de ces variations (rythme endogène ou non, régularité...), demanderaient à être précisées pour une meilleure compréhension du comportement de l'espèce et de ses conséquences sur l'organogénèse. L'existence actuelle de rythmes au sein de l'ortet d'origine et leur perpétuation au cours du clonage sont susceptibles de perturber, voire de fausser les comparaisons interclonales.

En effet, ces rythmes peuvent différer d'un clone à l'autre, ou ne pas être synchrones (Tran Thanh van, 1981). La prise en considération de ces éléments paraît souhaitable afin d'éviter, en fonction des espèces, des conclusions erronées car trop hâtives, particulièrement lors de l'analyse des phénomènes de «rajeunissement».

Pour un ortet donné, les différences d'état physiologique sont non seulement liées au facteur temps, mais également, semble-t-il, à l'architecture du végétal comme le montrent les dosages biochimiques effectués (gradients de polyphénols et de peroxydases) ou les méthodes d'analyse plus grossières : enracinement en fonction de la topographie des ramets sur l'ortet (Monteuuis, 1984). L'hétérogénéité inhérente aux échantillons de microboutures introduits *in vitro* pourrait être réduite lors du prélèvement sur le pied-mère (voir Tran Thanh van, 1980) par un choix ou tri des explants en fonction de critères morphologiques, architecturaux ou autres. Pratiquement, ces mesures préventives sont difficilement concevables du fait que nous avons affaire non plus à des formes architecturales bien structurées quoique complexes, mais au contraire à des pieds-mères véritables, constitués d'une profusion de pousses dont l'origine reste diffuse. La variabilité morphologique de ces réitérations provoquées par les excisions successives reflète, dans une certaine mesure, les bouleversements d'équilibres endogènes préexistants. Dès lors, l'adoption de références afin d'harmoniser les échantillons est problématique.

Le conditionnement *in vitro* des explants pourrait être un moyen de minimiser les effets perturbateurs, voire néfastes, de ces variations physiologiques. Nous avons vu les bienfaits sur l'enracinement d'une introduction



Photo 10. — Profusion de pousses axillaires, suite à la décapitation de l'axe principal. Milieu M20. A gauche, clone centenaire n° 15; à droite, clone juvénile 45.115.

primaire sur milieu enrichi en cytokinines. D'autre part, le suivi de sub-cultures semble indiquer une influence de la composition minérale du milieu sur la rythmicité des explants (Beaujard, 1984).

L'adoption de milieux de culture appropriés, utilisés selon une chronologie judicieusement déterminée, et combinés à l'influence de paramètres ambiants (froid, lumière) pourrait réduire l'hétérogénéité remarquée et permettre ainsi un meilleur contrôle des cultures.

8. conclusion

L'étude du microbouturage du séquoia géant montre que ce conifère peut être cultivé *in vitro* jusqu'à l'obtention de boutures saines enracinées. D'un point de vue pratique, la technique et la chronologie préconisées ne sont objectivement pas applicables à une production massale de plants destinés aux reboisements. A cette fin, le bouturage en conditions horticoles traditionnelles pratiqué dans les pépinières AFOCEL pour des clones juvéniles réactifs est comparativement beaucoup plus avantageux. Dans ce contexte, l'intérêt du microbouturage paraît se situer en amont du bouturage industriel, pour réactiver ou stocker des génotypes sélectionnés qui pourront être utilisés ultérieurement sous forme de pieds-mères par les pépiniéristes. Outre cette application rationnelle et salubre, les conditions de culture *in vitro* sont également très utiles pour l'analyse rigoureuse des aspects physiologiques inhérents au bouturage.

Ces différentes remarques incitent à considérer la micropropagation comme une voie complémentaire des techniques horticoles classiques afin de favoriser l'avènement de nouveaux clones sélectionnés de séquoia géant et contribuer ainsi à l'amélioration génétique de l'espèce.

BIBLIOGRAPHIE

- AITKEN-CHRISTIE J. (1984)
«Micropropagation of *Pinus radiata*»
The Plant Propagator, n° 30 (3) 9-11
- ARNOLD Von S., ERIKSSON T. (1981)
« Production of adventitious plants from spruce and pine »
Symposium on clonal Forestry, Uppsala, Sweden
Swedish University of Agricultural Sciences. Department of forest genetic,
7-31
- BEAUJARD F. (1984)
«Culture in vitro des bruyères et croissance rythmique chez l'*Erica x darleyensis* (Ericacées) »
Thèse de 3ème cycle, Angers
- BEKKAOUI F., ARNAUD Y., LARRIEU C. et MIGINIAC E. (1984)
« Étude comparative de la rhizogenèse *in vitro* du *Sequoia sempervirens* chez deux clones d'âge différent »
Annales Afocel 1983, 5-25
- BERTHON J.Y. (1985)
« Étude d'un marqueur biochimique de la rhizogenèse de *Sequoiadendron giganteum* (Lindl.) Buchholz cultivé *in vitro* »
D.E.A. Université de Clermont II, 52 p
- BONGA J.M. (1982)
« Tissue culture techniques »
In : Tissue Culture in Forestry, J.M. Bonga and D.J. Durzan, eds Martinus Nijhoff Dr W. Junk publishers, 4-30
- BORNMAN C., VOGELMANN T. (1984)
« Effect of rigidity of gel medium on benzyladenine-induced adventitious bud formation and vitrification in vitro of *Picea abies* »
Physiol. Plant., 61, 505-512
- BOULAY M. (1978)
« Multiplication rapide du *Sequoia sempervirens* en culture *in vitro* »
Annales Afocel 1977, 37-67
- BOULAY M. (1985)
« Aspects pratiques de la multiplication *in vitro* des essences forestières »
Annales Afocel 1984, 7-43
- DAGUIN F. (1984)
« Caractérisation d'un phénomène d'hypolignification chez *Salix babylonica* L. en culture *in vitro*. Rôle de l'azote ammoniacal »
Thèse de 3ème cycle, Université de Clermont II, 98 p.
- DAVID A. (1982)
« *In vitro* propagation of Gymnosperms »
In : Tissue Culture in Forestry, J.M. Bonga and D.J. Durzan, eds Martinus Nijhoff Dr W. Junk Publishers, 72-108
- DAVIES F.T. (1984)
« Shoot RNA, cambial activity and indolebutyric acid effectivity in seasonal rooting of juvenile and mature *Ficus pumila* cuttings »
Physiol. Plant., 62, 571-575

- DESTREMAU D.X., GUINAUDEAU F. (1980)
« Quelques espèces méconnues... : le séquoia géant »
Informations-Forêt, n° 149 (2) 93-107
- DORMLING I., KELLERSTAM H. (1981)
« Rooting and rejuvenation in propagating old Norway spruce by cuttings »
Symposium on clonal Forestry, Uppsala, Sweden
Swedish University of Agricultural Sciences. Department of forest genetic, 65-71
- DRUART P., KEVERS C., BOXUS P., GASPAR T. (1982)
« *In vitro* promotion of root formation by apple shoots through darkness effect on endogenous phenols and peroxidases »
Z. Pflanzen physiol. 108, 429-436
- FADL M.S., SARI EL-DEEN S.A., EL MAHDY M.A. (1979)
« Physiological and chemical factors controlling adventitious root initiation in carab *Ceratonia siligua* L. stem cuttings »
Egyptian Journal of Horticulture, 6, 55-68
- FOURET Y., ARNAUD Y., LARRIEU C. (1985)
« Rajeunissement *in vitro* du *Sequoia sempervirens* »
Annales Afocel 1984, 111-137
- GENDRAUD M. (1981)
« Étude de quelques propriétés des parenchymes de pousses de topinambour cultivées *in vitro* en relation avec leurs potentialités morphogénétiques »
Physiol. Vég. 19 (4) 473-481
- MARIGO G. (1973)
« Sur une méthode de fractionnement et d'estimation des composés phénoliques chez les végétaux »
Analisis, 2, 106-110
- MONCOUSIN C., GASPAR T. (1983)
« Peroxidase as a marker for rooting improvement of *Cynara scolymus* L. cultured *in vitro* »
Biochem. Physiol. Pflanzen. 178, 263-271
- MONTEUUIS O. (1985)
« La multiplication végétative du séquoia géant en vue du clonage »
Annales Afocel 1984, 139-171
- MURASHIGE T., SKOOG F. (1962)
« A revised medium for rapid growth and bioassays with Tabacco tissue cultures »
Physiol. Plant., 15, 473-497
- PAQUES M., BOXUS P. (1985)
« Vitrification : review of literature »
Symposium on « in vitro problems related to mass propagation of horticultural plants » 16th-20th september 1985. Gembloux
- RANCILLAC M., FAYE M., DAVID A. (1982)
« *In vitro* rooting of cloned shoots in *Pinus pinaster* »
Physiol. Plant., 56, 97-101

REYNOIRD J.P. (1983)

« Effet du pré-traitement par greffages successifs ou par pulvérisation de cytokinine sur la réactivation de douglas âgé en vue de la propagation végétative. Incidence de quelques facteurs du milieu de culture sur la croissance *in vitro* d'individus juvéniles »

D.E.A., Université de Paris VI, 40 p.

TRAN THANH VAN K. (1980)

« Control of morphogenesis by inherent and exogenously applied factors in thin cell layers »

International review of cytology, supplément 11A (7), 175-193

TRAN THANH VAN K. (1981)

« Control of morphogenesis in *in vitro* cultures »

Ann. Rev. Plant. Physiol., 32, 291-311

WALKER N., DUMAS E., FRANCKET A., BEKKAOUI F. (1985)

« Technique de culture *in vitro* des méristèmes de *Sequoia sempervirens* et *Pinus pinaster* »

Annales Afocel 1984, 87-109

YILMAZ-LENTZ D. (1984)

« Contrôle *in vitro* de la multiplication végétative, étude du déterminisme de la floraison chez quelques Gymnospermes »

Thèse de 3ème cycle, Université Paris-Sud, 71 p.

RÉSUMÉ

Les possibilités de propagation clonale de *Sequoiadendron giganteum* par microbouturage *in vitro* sont analysées. Les milieux de multiplication, d'allongement et de rhizogenèse mis au point permettent d'obtenir jusqu'à 100 % de vitroplants enracinés. Mais, à partir de cultures primaires introduites sur milieu de multiplication ou directement sur milieux d'allongement 4 à 5 mois auparavant, ces résultats ne sont pas répétables. L'état physiologique de l'explant au moment de son prélèvement sur le pied-mère paraît déterminant sur son devenir *in vitro* dans les conditions expérimentales définies et serait influencé par certains effecteurs du métabolisme auxinique (peroxydases et phénols). Les manifestations d'hyperhydrie constatées semblent liées aux conditions de culture, mais également à l'état physiologique du matériel végétal.

La technique de microbouturage présentée peut être utilisée à plusieurs fins : études physiologiques, conservation de génotypes, réactivation, production de plantules enracinées. ... Les observations réalisées après une sortie de tube et acclimatation aisées prédestinent les boutures à un rôle de pied-mère.

SUMMARY

Title of the article : « Micropropagation of giant sequoia »

The clonal *in vitro* micropropagation possibilities of *Sequoiadendron giganteum* are analysed. Up to 100 p.c. of rooted vitroplants are obtained by the chosen

multiplication, elongation and rooting media. But these results are not repeated, when primary cultures were introduced on a multiplication medium or directly on elongation media four to five months before. The physiological state of the explant at the moment of dissection from the mother plant seems to be decisive for its further *in vitro* development in the defined experimental conditions and it seems to be influenced by certain effectors of the auxin metabolism (peroxidases and phenols). The observed vitrification seems to be in relation with the culture conditions but also with the physiological state of the plants.

The presented micropropagation technique can be used for physiological studies, genotype conservation, reactivation, production of rooted plantlets.... The observations taken after transfer to the greenhouse and the easy acclimatization predestine the cuttings to the role of mother plants.

ZUSAMMENFASSUNG

Titel des Artikels : « Mikrovermehrung von *Sequoiadendron giganteum* »

In diesem Artikel werden die Möglichkeiten der klonalen *in vitro* — Vermehrung von *Sequoiadendron giganteum* analysiert. Mit den ermittelten Multiplikations — Streckungs— und Bewurzelungsmedien werden bis zu 100 % bewurzelte Vitropflanzen erhalten. Doch diese Ergebnisse erneuern sich nicht, wenn primäre Kulturen in ein Multiplikationsmedium oder direkt in Streckungsmedien vier bis fünf Monate vorher eingeführt worden sind.

Der physiologische Zustand des Explantats zur Zeit der Entnahme scheint für seine *in vitro*-Entwicklung unter den angegebenen experimentalen Bedingungen ausschlaggebend zu sein und von bestimmten Auxin-Stoffwechselanregern (Peroxidasen und Phenolen) beeinflusst sein.

Die beobachtete Vitrifikation scheint mit den Kulturbedingungen, aber auch mit dem physiologischen Zustand des vegetalen Materials in Verbindung zu stehen.

Die Mikrovermehrung kann verschiedenen Zwecken dienen : physiologische Untersuchungen, Genotyp-Erhaltung, Reaktivierung, Produktion bewurzelter Pflänzchen. Die angestellten Beobachtungen nach der Übertragung ins Gewächshaus und die leichte Akklimatisierung bestimmen die Stecklinge zur Rolle von Mutterpflanzen vor.

